

マイクロ加工に基づくイオンチャネルセンサに関する研究

著者	大嶋 梓
号	4
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医工博第26号
URL	http://hdl.handle.net/10097/59710

氏名（本籍地）	おおしま あずさ 大嶋 梓		
学 位 の 種 類	博 士（医工学）		
学 位 記 番 号	医工博 第 26 号		
学位授与年月日	平成25年 3月27日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科、専攻	東北大学大学院医工学研究科（博士課程）医工学専攻		
学位論文題目	マイクロ加工に基づくイオンチャネルセンサに関する研究		
論文審査委員	（主査）東北大学教 授 吉信 達夫 東北大学教 授 松木 英敏 東北大学教 授 庭野 道夫 東北大学教 授 永富 良一 東北大学准教授 平野 愛弓		

論 文 内 容 の 要 旨

第1章 序論

イオンチャネルは高感度な分子認識機能を持つタンパク質であり、創薬のターゲットとなっている。イオンチャネルを脂質二分子膜に包埋した再構成系は、創薬スクリーニングや高機能バイオセンサへの応用が期待されている。しかし、チャネルタンパク質の機能を保持する唯一のマトリクスである脂質二分子膜は、機械的強度が低く、センサ開発への障害となってきた。近年、脂質二分子膜の安定化を目指し、半導体加工技術や Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) 技術を使用した脂質二分子膜の形成法が報告されているが、その多くが多量の有機溶媒を用いており、膜中に残存する有機溶媒の影響も問題となっている。論文執筆者は修士論文にて、膜形成場となる小孔を、そのエッジ形状が nm オーダーで平滑になるようにシリコン (Si) チップ中に作製することにより、機械的強度の高い二分子膜を有機溶媒を極力減じた状態で形成できることを見出した。しかし、Si チップ由来の電気容量が大きく、この膜系にはノイズ電流幅や過渡応答特性に課題があることも判明した。本論文では、この電気特性を向上するための加工について検討し、形成した二分子膜についてノイズ電流幅と過渡応答特性等の電気特性を評価するとともに、モデルチャネルの電流計測を行い、構築した二分子膜の機能性を評価した。さらに、創薬のターゲットとなる、電位依存性カリウムチャネル、リガンド作動性チャネルを各発現細胞から抽出し、電気特性の改良を行った Si チップに形成した二分子膜に包埋し、そのチャネル電流測定を行った。

第2章 二分子膜センサの電気特性の改良

本章では、安定化に成功した脂質二分子膜の電気特性の向上について検討を行った。Si チップの小孔に形成した二分子膜は十分な安定性を有していたが、測定される電流はバックグラウンドノイズおよび過渡応答が大きく、創薬のターゲットになるイオンチャネルの測定には不向きであった。ノイズ・過渡応答の由来を支持体である Si チップの合成電気容量であると考え、支持体に絶縁層を追加することにより、合成電気容量の減少を目指した。絶縁層材料の条件としては、支持体の電気容量の主成分

と予想される Si_3N_4 層（厚さ 200-240 nm）より誘電率が低いこと、また脂質分子の水面への展開に用いる有機溶剤（クロロホルム、*n*-ヘキサデカン）への耐性が必要と考え、絶縁層材料として SiO_2 （熱酸化膜）および Teflon を用いた。この SiO_2 や Teflon は、以前より二分子膜の支持体材料に使用されており、チャンネル計測系との適合性も高い。脂質二分子膜の安定化は Si チップ小孔のエッジ形状が重要と考えられるため、現行の形状を維持した状態での絶縁層被覆について検討した。すなわち、一度完成した支持体に熱酸化によって SiO_2 層を堆積させ、Teflon 層のパターニングを行い、小孔付近を除いた Si チップ表面に絶縁層を被覆した。このようにして絶縁層（酸化膜・Teflon 層）を追加した Si チップと従来の Si チップの表面をシランカップリング剤によって疎水化し、単分子膜張り合わせ法により二分子膜を形成し、その電気特性の比較を行った。その結果、絶縁層がない Si チップでは合成電気容量は $252 \pm 19 \text{ pF}$ ($n=49$) であったのに対し、絶縁層を追加した Si チップでは合成電気容量は $40 \pm 4 \text{ pF}$ ($n=80$) まで減少した。電気容量の低下に伴い、ノイズ幅は $\sim 6 \text{ pA}$ から $\sim 2 \text{ pA}$ まで減少した。過渡応答によるモデルチャンネル電流の遅れについても $\sim 13 \text{ ms}$ から $< 1 \text{ ms}$ まで減少し、応答速度が向上した。さらに絶縁層を追加した Si チップは、絶縁層のない Si チップと同様に、溶液交換に耐えられる十分な膜安定性を有していた。これらの結果から、生体チャンネル電流測定に適した二分子膜形成場となる支持体の作製に成功した。

第 3 章 hERG チャンネルセンサの構築

心筋の電位依存性カリウムチャンネル human *ether-a-go-go*-related gene (hERG) チャンネルは心筋の活動電位の再分極過程において中心的役割を担っている。一方でこのチャンネルは薬剤に対して敏感で様々な市販の医薬品と反応して副作用（不整脈）を頻発することがわかり、この副作用により多種多様な医薬品が市場からの撤退を余儀なくされた。このような背景を受け、近年、副作用評価の観点から創薬における hERG チャンネルの重要性が高まっている。本章では、第 2 章で電気特性を向上させた Si チップを支持体として使用し、形成した二分子膜に hERG チャンネルを包埋した hERG チャンネルセンサを構築し、そのチャンネル電流および薬品反応性を評価した。hERG チャンネルを発現した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を購入し、この細胞から hERG チャンネルを膜画分の状態で抽出して二分子膜への包埋を行った。測定された電流の単一チャンネルコンダクタンスは 12 pS であり、生体膜中の hERG チャンネルのパッチクランプ法での報告値と一致した。このチャンネル電流は hERG チャンネルに特異的阻害剤である E-4031 によって阻害された。さらに溶液交換により、E-4031 を系から洗い流し、チャンネル電流を回復させ、hERG チャンネルへの副作用のために使用停止となった抗ヒスタミン剤 Astemizole を添加したところ、チャンネル電流は阻害された。また、hERG チャンネルに特徴的な電位依存性およびカリウム濃度依存性も観測された。以上の結果より、hERG チャンネルの機能（チャンネルコンダクタンス、薬物応答性、電位依存性、カリウム濃度依存性）を保持した状態で Si チップ中に hERG チャンネルを再構成することに成功した。本研究の二分子膜では数 10 時間の測定が可能であり、1 枚の膜あたりのスループットの向上も期待できる。hERG チャンネルへの副作用評価の効率化は、新薬開発における緊急の課題となっている。本研究で構築した安定化脂質二分子膜に基づく hERG チャンネルセンサをアレイ状へと展開することができれば、パッチクランプと相補的な高スループット副作用評価チップの登場であり、今後の発展が期待される。

第 4 章 グルタミン酸受容体チャンネルセンサの構築

本章では代表的なリガンド作動性チャンネルである NMDA 型グルタミン酸受容体チャンネル

(NMDAR)を対象に、第2章で構築した二分子膜中への包埋とチャネル電流の測定を行い、NMDARチャネルセンサの構築について検討した。NMDARの発現については昆虫細胞への発現系の構築から検討をはじめた。NMDARのサブユニットであるNR1およびNR2Aのパキユロウィルスを作成して昆虫細胞 Sf9 に感染させ、ウェスタンブロットを用いて NR1, NR2A の発現を確認した。この Sf9 細胞から NMDAR を抽出し、Si チップ中の二分子膜中への包埋について検討した。その結果、NMDAチャネルの二分子膜への包埋には、機能性をもって発現しているタンパク質の濃度の最適化が重要であることを見出している。今後の課題として NMDAR の発現率の上昇と、蛍光イメージングに基づく Ca^{2+} 流入の測定のような機能発現の確認の必要性について議論しており、生体チャネルセンサ構築のための一つの指針を示している。

第5章 総括

本研究では、論文執筆者が修士課程において構築した Si チップ中の安定化脂質二分子膜の電気特性の向上と生体チャネルの包埋について検討した。この脂質二分子膜においては、膜中に残存する可能性のある有機溶剤の使用量が少なく、脆弱なイオンチャネルに適していると考えられる。実際に本研究の二分子膜中に包埋した hERG チャネルは生体膜中と同様の薬剤応答、カリウム濃度依存性を示しており、本研究で開発した膜系が生体チャネルの測定に適していることを示唆している。さらに、本膜系は機械的強度が高いため、溶液交換や数 10 時間におよぶ長時間の測定が可能であった。これは、同一の二分子膜において複数の薬剤の効果、または薬剤の効果の長時間観察を可能にするものであり、測定の高スループット化につながる。このように安定かつイオンチャネルを変性させない二分子膜系は、生体由来のイオンチャネルの電流測定のためのプラットフォームとして、今後のさらなる発展が期待される。

再構成系の利点はイオンチャネル周囲の化学組成が制御できることに加えて、シングルチャネル電流の記録が比較的容易である点があげられる。パッチクランプによるチャネル電流測定は現在、ホールセル電流（全細胞電流）が主流となっているが、シングルチャネル電流記録では開閉キネティクスに関するより多くの情報が得られるため、再構成系でのシングルチャネル電流解析はパッチクランプで得られる知見を補完することができると期待される。一方、本膜系を含む二分子膜再構成系が発展していくための課題として、イオンチャネルの膜への包埋がある。現在、二分子膜へのチャネル包埋は実験者の手技に依存することが多く、経験則から添加タンパク質の濃度を決めており、チャネルの包埋における確率、個数そして配向性の制御が課題となっている。本論文においても、包埋の促進に関して、従来から行われてきた攪拌のみならず、溶液温度や添加タンパク質の濃度を上昇させることについて検討している。配向性に関しては、細胞からイオンチャネルを可溶化前の膜面分に含まれた状態で抽出すると、包埋した時にチャネルの向きが~70%の確率で揃うことを第3章で述べた。現在、再構成系で測定されているイオンチャネルは単独で動作するタイプだけであるが、イオンチャネルの包埋を制御できれば、様々なイオンチャネルを並列させ、その相互によるチャネル電流の測定への可能性がみえてくるであろう。また、本論文では、1つの小孔中の二分子膜による測定であるが、本研究グループは小孔を複数個配列したアレイ化の構築と複数サンプル同時計測にも成功している。したがって、本研究で構築したイオンチャネルセンサをアレイ化して、多サンプル同時計測法へと発展させるためにも包埋の制御が課題となっている。このように、イオンチャネルの二分子膜への包埋を制御することは、創薬スクリーニングやバイオセンサとして脂質二分子膜再構成系の発展につながるため、今後の二分子膜研究においてはチャネル包埋の制御が焦点となっていくであろう。

論文審査結果の要旨

イオンチャネルは高感度な分子認識機能を持つタンパク質であり、創薬における主ターゲットである。イオンチャネルを脂質二分子膜に包埋した再構成系は、創薬スクリーニングや高機能バイオセンサへの応用が期待されている。しかし、チャネルタンパク質の機能を保持する唯一のマトリクスである脂質二分子膜は、機械的強度が低く、そのことがセンサ開発への障害となってきた。本研究では、著者が博士課程において安定化に成功した脂質二分子膜にイオンチャネルの再構成を行い、イオンチャネルセンサの開発を行ったものであり、全編5章からなる。

第1章は序論であり、本研究の背景、目的を述べている。

第2章では、安定化に成功した脂質二分子膜の電気特性の向上を行っている。安定化を達成した従来の二分子膜は、バックグラウンドノイズや過渡応答が大きく、創薬ターゲットとなる生体チャネル電流の測定には不向きであった。本章では、支持体に絶縁層を追加することにより、支持体由来の電気容量を減少させ、生体チャネル電流の測定に適した二分子膜形成に成功している。これは生体チャネルチップへの展開に向けた大きな成果である。

第3章では、第2章で電気特性を向上させた支持体を使用し、形成した二分子膜に心筋の電位依存性カリウムチャネル *human ether-a-go-go-related gene* (hERG)チャネルを包埋し、そのチャネル電流を評価した。観測された電流は、hERGに特徴的なコンダクタンス、電位依存性、薬物反応性、カリウム濃度依存性を示し、hERGチャネルをその機能を保持したまま人工膜中に再構成することに成功している。これは、創薬のための副作用評価チップの可能性を拓く重要な成果である。

第4章では、代表的なリガンド作動性チャネルであるグルタミン酸受容体チャネルを対象に、イオンチャネルセンサの包埋について検討し、チャネルの包埋にはタンパク質濃度の最適化が重要であることを見出している。これは、生体チャネルセンサの効率的な構築のための重要な知見である。

第5章は結論であり、人工二分子膜再構成系における課題や展望について述べている。

以上要するに本論文は、イオンチャネルというバイオ素子と半導体微細加工技術を融合することにより、イオンチャネルを対象とした高感度な機能・副作用評価チップを実現する可能性を示したものであり、その成果は、医工学および創薬技術の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（医工学）の学位論文として合格と認める。